

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 41 28 953 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 41 28 953.6
㉑ Anmeldetag: 30. 8. 91
㉒ Offenlegungstag: 4. 3. 93

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 12 N 11/14
C 12 M 3/00
C 03 C 17/28
// C12N 5/06,5/10,
5/16,C07K 15/04,
A61K 37/02

DE 41 28 953 A 1

㉑1 Anmelder:
BASF AG, 6700 Ludwigshafen, DE

㉑2 Erfinder:
Reuschenbach, Peter, Dr., 6703 Limburgerhof, DE

㉑4 Verfahren zur Kultivierung von Säugerzellen im Fließbettreaktor

㉑7 Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur
Kultivierung von Säugerzellen im Fließbettreaktor.

DE 41 28 953 A 1

Die Kultivierung von Säugerzellen ist die Grundlage für eine Vielzahl von biotechnologischen Produktionsverfahren, insbesondere der Herstellung von Pharmaproteinen.

Die Kultivierung von Säugerzellen im Fließbettreaktor unter Verwendung von Trägerkörpern ist bekannt. Von Looby und Griffiths werden in einem Übersichtsartikel (TIBTECH August 1990, 204 – 209) verschiedene Trägerkörper für die Kultivierung von Zellen im Fließbettreaktor verglichen. Besonders hohe Zellausbeuten werden mit Trägerkörpern erhalten, die aus Kollagen (Verax®) bestehen.

Jedoch können diese Trägerkörper nicht autoklaviert und auch nicht wiederverwendet werden.

Trägerkörper aus Glas (z. B. Siran®) sind wiederverwendbar und autoklavierbar, jedoch ist die Zellausbeute bei diesen Trägerkörpern deutlich geringer als bei Verax® (TIBTECH August 1990, 204 – 209).

Aus der Offenlegungsschrift EP 3 03 262 ist ein Trägerkörper aus Glas oder Keramik mit aminhaltiger Oberflächenschicht bekannt; die Verwendung dieser Trägerkörper für die Säugerzellkultur wird jedoch nicht beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur Kultivierung von auf Trägerkörpern immobilisierten Säugerzellen bereitzustellen, bei dem die Trägerkörper eine hohe Zellausbeute gewährleisten, autoklavierbar, leicht reinigbar und wiederverwendbar sind.

Demgemäß wurde gefunden, daß das Verfahren zur Kultivierung von Säugerzellen im Fließbettreaktor besonders vorteilhaft ist, wenn die Säugerzellen auf porösen Trägerkörpern aus Glas, deren Oberflächenschicht an einen Träger gebundene Aminogruppen enthält, immobilisiert werden. Außerdem wurde gefunden, daß eine Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) enthaltende Oberflächenschicht besonders gut geeignet ist. Weiterhin wurde gefunden, daß sich mit diesem Verfahren besonders gut die Maus-Fibroblastenzelllinie C-127 (ATCC CRL 1616) kultivieren läßt.

Die porösen Trägerkörper aus Glas können in beliebiger Gestalt vorliegen; bevorzugt werden sie in einer kugelförmigen Gestalt verwendet.

Die Größe der Trägerkörper beträgt zweckmäßig von 0,4 bis 5 mm, bevorzugt 1 bis 2 mm.

Die Porengröße der porösen Trägerkörper beträgt im allgemeinen 20 bis 500 µm, bevorzugt 60 bis 300 µm.

Darüber hinaus können in den Trägerkörpern auch sogenannte Mikroporen von 1 bis 10 µm vorhanden sein.

Bevorzugt werden offenporige Sinterglas-Trägerkörper, z. B. der Marke Siran® (Schott, Mainz) verwendet. Die Trägerkörper können aus Kalk-Natron-Glas oder aus Borosilikatglas bestehen. Besonders bevorzugt werden Sinterglas-Trägerkörper aus Borosilikatglas.

Die Beschichtung der gläsernen Trägerkörper mit Träger gebundenen Aminogruppen, insbesondere DEAE-Dextran-Gruppen ist in der Offenlegungsschrift EP 3 03 262 beschrieben. Wie dort erwähnt, kann die Beschichtung sowohl adsorptiv als auch kovalent erfolgen. Als Aminogruppen eignen sich Dialkylaminogruppen, insbesondere Dialkylaminoalkylgruppen, wobei die Alkylgruppen zweckmäßig 1 bis 4 C-Atome aufweisen. Als an Träger gebundene Aminogruppen kommen Aminogruppen, die mit einem Polymer, z. B. einem Polysaccharid kovalent verknüpft sind, in Frage. Bevorzugt werden Aminogruppen, die an Glucose, insbesondere Dextran gebunden sind. Besonders bevorzugt wird Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) verwendet.

Die in ihrer Oberflächenschicht Träger gebundene Aminogruppen enthaltenden gläsernen Trägerkörper sind kommerziell erhältlich (Schott, Mainz, Produktinformation Nr. 6196d).

Als Säugerzellen eignen sich für das erfindungsgemäße Verfahren sowohl adhärente als auch in Suspension wachsende Säugerzellen. Es können permanente Zelllinien oder Primärkulturen verwendet werden. Auch gentechnisch veränderte (rekombinante) Zelllinien können eingesetzt werden. Bevorzugt werden Hybridomzellen und Fibroblasten, insbesondere die Maus-Fibroblasten Zelllinie C-127 verwendet (ATCC CRL 1616). Besonders bevorzugt wird die den Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) sekretierende Zelllinie C-127, die mit einem Rinderpapillomvirus-Expressionsvektor transformiert worden war, verwendet. Die Herstellung dieser Zelllinie ist von Reddy et al. (J. Cell. Biochem. supplement 10 D, 154, 1986) beschrieben worden.

Als Fließbettreaktoren für das erfindungsgemäße Verfahren sind die üblichen Bioreaktoren geeignet, wie sie z. B. von Looby und Griffiths (Cytotechnology 1, 339 – 346, 1988; Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses, Eds. Spier et al., Butterworths, Guilford, 336 – 344, 1989) beschrieben werden.

Das Volumen der Trägerkörper im nichtexpandierten Zustand beträgt üblicherweise 10 bis 80%, bevorzugt 20 bis 60% des Reaktorvolumens.

Als Nährmedien zur Kultivierung der Säugerzellen können alle üblichen Zellkulturmedien verwendet werden. Es können auch Serum-freie Nährmedien verwendet werden. Ob Serum zugesetzt werden muß, hängt von der verwendeten Säugerzelle ab.

Die Immobilisierung der Säugerzellen auf den Trägerkörpern geschieht zweckmäßigerweise dadurch, daß die Säugerzellen durch konventionelle Zellkulturtechniken vorgezüchtet werden und anschließend in den die Trägerkörper enthaltenden Fließbettreaktor eingebracht werden, so daß im Reaktor eine Zelldichte von $5 \cdot 10^4$ bis $1 \cdot 10^6$, bevorzugt von 1 bis $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml vorliegt.

Die Kultivierung der Säugerzellen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann kontinuierlich oder diskontinuierlich betrieben werden. Bevorzugt wird jedoch kontinuierlich gearbeitet.

Als erfindungsgemäße Kultivierung kommen sowohl die Zellvermehrung als auch die Nährstoffversorgung von Zellen ohne Zellvermehrung in Betracht.

Beide Kultivierungsverfahren werden insbesondere bei der Herstellung von Proteinen aus Zellen mit gutem Erfolg angewendet.

Zweckmäßigerweise wird dabei in einer ersten Phase (der Wachstumsphase) durch Zellvermehrung eine große Zellzahl erzeugt und anschließend in einer zweiten Phase (der Produktionsphase) von diesen Zellen der Wertstoff gebildet.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, Säugerzellen bis zu einer hohen Dichte auf porösen Trägerkörpern zu kultivieren. Die Trägerkörper besitzen ausgezeichnete mechanische Eigenschaften, so daß im Fließbettreaktor z. B. kein die Zellausbeute verringernder Abrieb entsteht. Weiterhin sind diese Trägerkörper durch Heißdampf autoklavierbar; sie können z. B. im Reaktor vor Beginn der Kultivierung sterilisiert werden. Dadurch ist es auch möglich, die Trägerkörper nach Reinigung und Sterilisation wieder zu verwenden.

Die Erfindung wird durch folgende Beispiele veranschaulicht:

Beispiel 1

Kultivierung einer t-PA sekretierenden C-127 Zelllinie auf DEAE-Dextran-beschichteten Siran®-Trägerkörpern

Die Experimente wurden mit einer adhären, t-PA sekretierenden C-127 Mausfibroblastenzelllinie, die mit einem Rinder-Papillomvirus-Expressionsvektor transformiert waren, durchgeführt (J. Cell. Biochem., supplement 10 D, 154, 1986).

Die Anzucht der Säugerzellen erfolgte zunächst in handelsüblichen Zellkulturflaschen. Dazu wurden Zellkulturflaschen mit $0,5 - 1,0 \times 10^5$ Zellen beimpft. Als Wachstumsmedium wurde DMEM-Medium (4,5 g Glucose pro Liter, 584 mg Glutamin pro Liter), foetales Kälberserum (10%) und Polyalkylenglykol (Pluronic F-68®) (0,15%) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in einem für Zellkulturen geeigneten Brutschrank bei 37°C. Beatmet wurden die Kulturen mit einem Gasgemisch bestehend aus Luft und CO₂ (7%). Nach 2 bis 3 Tagen wurde das verbrauchte Medium entfernt und die am Boden haftenden Zellen mit einem Gemisch aus Trypsin (0,125%) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,02%), gelöst in PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Phosphatpuffer) gelöst. Der Ablösevorgang wurde durch DMEM (4,5 g Glucose pro Liter, 584 mg Glutamin pro Liter), foetales Kälberserum (10%) und Polyalkylenglykol (Pluronic F-68®) (0,15%) gestoppt, nachdem der überwiegende Teil der Zellen in Suspension gegangen war. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Häemocytometers ermittelt und die Zellen anschließend in einen Fließbett-Reaktor überführt.

Der Fließbett-Reaktor bestand aus einem mit einem Doppelmantel versehenen, 3,2 cm x 28 cm langen, am unteren Ende konisch zusammenlaufenden Glaszylinder und einem ebenfalls mit einem Doppelmantel versehenen, 2,8 x 13 cm großen Konditionierungsgefäß. Das Gesamtvolumen der Einheit inklusive der Verbindungsschläuche betrug 380 ml. Das Medium wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe zwischen Konditionierungsgefäß und Fließbett-Reaktor mit einer Geschwindigkeit von 20 bis 60 cm pro Minute gefördert. Eine Edelstahlkugelschüttung (3 mm Durchmesser, 25 ml Volumen) im konisch zusammenlaufenden Teil des Reaktors bewirkte eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit und der porösen Trägerkörper im Reaktor. Frisches Medium wurde über eine Schlauchpumpe ins Konditionierungsgefäß geleitet und verbrauchtes Medium via Überlauf aus dem Konditionierungsgefäß entfernt.

Der Medien austausch wurde am 3. Tag mit einer Austauschrate von 0,5 Reaktorvolumen pro Tag begonnen und in der Produktionsphase schrittweise auf einen mittleren Wert von 4,3 Reaktorvolumen pro Tag erhöht.

Temperiert wurde das System über die Doppelmäntel des Reaktors und des Konditionierungsgefäßes mit Hilfe eines Wasserbades. Die Inkubationstemperatur betrug in den ersten 6 Tagen 37°C, danach 35°C. Der Sauerstoffpartialdruck wurde auf 30% (Luftsättigung) eingestellt. Dieser Partialdruck wurde mit Hilfe einer Meß- und Regeleinheit durch automatische Einleitung von Luft in den Kopfraum bzw. Sauerstoff in die Flüssigkeit des Konditionierungsgefäßes aufrechterhalten. Der pH-Sollwert wurde durch automatische Zudosierung von CO₂ in den Kopfraum des Konditionierungsgefäßes zwischen pH 6,9 und 7,2 geregelt.

120 ml poröse, mit einer DEAE-Dextran-Oberflächenschicht versehene Sinterglas-Trägerkörper (Siran®) mit einem Durchmesser von 1 bis 2 mm und einer Porengröße zwischen 60 bis 300 µm dienten als Trägermaterial für die C-127 Zellen.

Der Reaktor wurde mit 7×10^5 Zellen/ml beimpft. Als Kulturmedium wurde in den ersten 6 Tagen DMEM-Medium (4,5 g Glucose pro Liter, 584 mg Glutamin pro Liter), foetales Kälberserum (10%) und Pluronic F-68® (0,15%) verwendet. Nach 6 Tagen wurde auf ein Medium bestehend aus Zellkulturmedium (IGI®, Genzyme), Glutamin (292 mg/l), Insulin (5 mg/l), Polyalkylenglykol (Pluronic F-68®) (0,15%), Rinderserumalbumin (150 mg/l) und foetales Kälberserum umgestellt. Die Serumkonzentration im Medium wurde stufenweise von 10% zu Beginn der Fermentation auf 0% am 16. Tag reduziert.

Mit der Umstellung auf serumfreies Medium am 16. Tag war die Wachstumsphase abgeschlossen und die Produktionsphase begann. Die Produktionsphase dauerte 90 Tage.

Die amidolytische Aktivität des sekretierten Proteins wurde mit Hilfe des COA-Set (S 2251, Kabi vitrum) bestimmt. Die Zellzahl wurde aus dem Sauerstoffverbrauch abgeleitet.

Das Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Züchtung von C-127 Zellen auf DEAE-Dextran-Oberflächenschicht enthaltenden Siran®-Trägerkörpern. Die Daten wurden in der Produktionsphase (16.—106. Tag, serumfreies Kulturmedium) ermittelt

Prozeßparameter	DEAE-Gruppen enthaltende Siran®-Trägerkörper
Zelldichte (Zellen/ml)	$2,6 \times 10^7$
t-PA Konzentration (mg/l)	38,3
t-PA Produktivität (mg/l \times Tag)	163
spezifische Produktivität (pg/Zelle \times Tag)	6,4
Perfusionsrate (pro Tag)	4,3

Beispiel 2 (Vergleichsbeispiel)

Kultivierung einer t-PA-sekretierenden C-127 Zelllinie auf Kollagen-Trägerkörpern (Verax®)

Die gleiche Zelllinie wurde im gleichen Reaktor, wie in Beispiel 1 beschrieben, kultiviert.

Anstelle von 120 ml DEAE-Dextran-Oberflächenschicht enthaltenden Siran®-Trägerkörpern wurden 90 ml poröse Kollagen-Trägerkörper der Firma Verax Corporation, Lebanon, USA (Verax VX-100®) verwendet.

Die Produktionsphase dauerte 49 Tage.

Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Züchtung von C-127 Zellen auf Kollagen-Trägerkörpern (Verax VX-100®)

Die Daten wurden in der Produktionsphase (16.—65. Tag, serumfreies Kulturmedium) ermittelt

Prozeßparameter	Kollagen-Trägerkörper (Verax VX-100®)
Zelldichte (Zellen/ml)	$2,1 \times 10^7$
t-PA Konzentration (mg/l)	37,7
t-PA Produktivität (mg/l \times Tag)	160
spezifische Produktivität (pg/Zelle \times Tag)	7,8
Perfusionsrate (pro Tag)	4,2

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kultivierung von Säugerzellen im Fließbettreaktor, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Säugerzellen auf porösen Trägerkörpern aus Glas, deren Oberflächenschicht an einen Träger gebundene Aminogruppen enthält, immobilisiert werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Diethylaminoethyl-Dextran enthaltende Oberflächenschicht verwendet wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Säugerzellen die Maus-Fibroblastenzelllinie C-127 verwendet wird.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Gewebefibrinogenaktivator sekretierende rekombinante Zelllinie C-127 verwendet wird.